

動物由来感染症の対応に関する研究

分担研究課題：動物由来新興ウイルスの血清診断法と感染初期過程に関する研究

研究分担者：福士秀悦（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨：中東呼吸器症候群（MERS）は2012年にサウジアラビアで最初に報告のあった、新型のコロナウイルスによる感染症である。原因ウイルスである MERS コロナウイルス（MERS-CoV）はコウモリあるいはラクダがヒトへの感染源と推測されているが、これまでのところ調査された地域、動物種は限られており、ウイルスの分布が中東地域に局限するのか、また、ウイルスがどのように自然宿主動物からヒトへ伝播するのか、その経路は今でも不明な点が多い。本研究は、ハイスループットかつ特異性の高い MERS-CoV 抗体検出法を開発し、MERS 血清疫学の技術基盤を確立することを目的とし、MERS-CoV の N および S タンパク質の発現、精製を行った。さらに、MERS-CoV のモノクローナル抗体を作製し、これらの反応性を解析した。MERS-CoV の感染初期過程を解析するためのツールとして MERS-CoV の S タンパク質を外套した VSV シュードタイプの作製を試みた。

研究協力者：松山州徳、白戸憲也、谷 英樹、福間藍子、吉河奈緒子、大西和夫、（国立感染症研究所）、梁 明秀（横浜市立大学）

A. 目的：

重篤な新興ウイルス感染症のほとんどは動物由来感染症である。動物由来新興ウイルスのヒトへの感染リスクを評価するためには、これらのウイルスの自然宿主動物を同定し、ヒトへの感染経路を解明しなければならない。2012年に中東地域で発生した中東呼吸器症候群(MERS)の原因ウイルス

である MERS コロナウイルス(MERS-CoV)はコウモリあるいはラクダがヒトへの感染源と推測されている。しかし、これまでのところ調査された地域、動物種は限られており、ウイルスの分布が中東地域に局限するのか、また、ウイルスがどのように自然宿主動物からヒトへ伝播するのか、その経路は今でも不明な点が多い。本研究は、ハイスループットかつ特異性の高い MERS-CoV 抗体検出法を開発し、これを利用した MERS 血清疫学の技術基盤を確立することを目的とする。また、MERS-CoV 感受性細胞域を調べ、感受性細胞への吸着・

侵入機構を明らかにすることは、動物からヒトへ伝播する分子メカニズムの解明に重要である。このため MERS-CoV の擬似ウイルス (VSV シュードタイプ) を作製し、これを利用したウイルス感染初期過程の解析を行う。

#### B. 材料と方法：

- 1) 組換えバキュロウイルス発現系を用いて MERS-CoV N および S タンパク質の発現および精製を行った。
- 2) BHK 細胞に MERS-CoV N および S タンパク質を発現させ、これらを用いて、MERS-CoV N および精製 MERS-CoV を免疫して得られたモノクローナル抗体(mAb)の反応性を解析した。
- 3) MERS-CoV の S タンパク質を 293T 細胞に発現させ、VSV シュードタイプの種ウイルスを接種し、MERS-CoV S タンパク質を外套した VSV シュードタイプ (MERSpv) を作製した。
- 4) MERS-CoV を感染させたラットから採取された血清を用いて、MERS-CoV および MERSpv に対する感染中和を解析した。

#### C. 研究成果：

- 1) 組換えバキュロウイルス発現系を用いて C 末端に His-tag を付加した MERS-CoV N および S タンパク質の発現を行った (図 1)。N タンパク質全長を発現する組換えバキュロウイル

スを昆虫細胞(Tn5)に感染させ、感染細胞中より 2M Urea 存在下で Ni カラムで精製した。また、MERS-CoV S タンパク質の膜貫通および細胞質内領域を欠損させ、細胞外領域のみ(Sect)を発現する組換えバキュロウイルスを Tn5 に感染させ、細胞培養液中より可溶性の Sect を Ni カラムで精製した。これらの精製タンパク質をウサギに免疫し、抗血清を作製中である。

- 2) MERS-CoV N および S タンパク質を BHK 細胞に発現させた。MERS-CoV N および精製 MERS-CoV を免疫して得られた mAb の反応性をウエスタンおよび蛍光抗体法で解析した。MERS-CoV N に対する mAb のうち、4 クロームは全て MERS-CoV N に特異的に反応した。ウエステンの反応パターンから、mAb#46 は他の 3 種類の mAb(mAb#1,41,45)とはエピトープが異なると考えられた (図 2)。精製 MERS-CoV を免疫して得られた mAb のうち、7 クロームが MERS-CoV S に特異的に反応した (図 3)。
- 3) MERS-CoV の S タンパク質を 293T 細胞に発現させ、MERS-CoV S タンパク質を外套した VSV シュードタイプ (MERSpv) を作製した (図 4)。MERS-CoV を接種したラットから血清を採取し、MERS-CoV および MERSpv に対する感染中和を解析した (図 5)。MERS-CoV そのものに対し

て中和活性を示したラット血清は MERSpV を中和しなかった。MERSpV は他のウイルス（例えばアレナウイルス）と比較し、感染価が 1 / 100 程度と低く（データ示さず）、このため、作製した MERSpV の感染の特異性は低いと考えられた。

#### D. 考察：

- 1) MERS-CoV の N および S タンパク質の発現及び精製を行った。従来、同様の手法で作製、精製されたタンパク質を抗原として用い、IgG-ELISA 等による新興ウイルス感染症の抗体検出法の開発を行ってきた。しかし、MERS-CoV の場合、ヒトの間で一般的に流行しているコロナウイルス OC43 や、コウモリコロナウイルス HKU4 と血清学的に交差するため、本研究で作製した N および S タンパク質を抗原として用いた ELISA では MERS-CoV 特異的抗体の検出は困難であると考えられる。そこで、MERS-CoV N あるいは S に対する mAb（図 2 および 3）を用いた競合 ELISA による MERS-CoV 特異的抗体検出法を開発予定である。また、本研究で得られた MERS-CoV の N および S タンパク質をウサギに免疫して抗血清を作製し、競合 ELISA の陽性コントロール血清として用いる予定である。
- 2) MERS-CoV 感染ラット血清を用いた

中和試験では、MERS-CoV そのものを用いた中和結果と MERSpV を用いた中和結果が一致しなかった。これは、MERSpV は他のウイルス（例えばアレナウイルス）と比較し、感染価が 1 / 100 程度と低く、このため、MERSpV の感染の特異性は低いためであると考えられた。重症呼吸器症候群コロナウイルス(SARS-CoV)の VSVS シュードタイプの場合、SARS-CoV S タンパク質の細胞質内ドメイン 19 アミノ酸を欠失させると、感染価が上がるということが知られている。今後、感染価の高い MERSpV を作製するため、MERS-CoV S の細胞質内ドメインの欠失変異体の作製を進める予定である。

#### E. 結論

- 1) ハイスループットかつ特異性の高い MERS-CoV 抗体検出法を開発するため、MERS-CoV N および S タンパク質の発現および精製を行った。
- 2) MERS-CoV N あるいは S に対する mAb を用いた競合 ELISA による MERS-CoV 特異的抗体検出法を開発する予定である。
- 3) MERS-CoV の S タンパク質を外殻した VSV シュードタイプ(MERSpV)を作製した。MERS-CoV に対する中和試験のための十分な感染価が得られなかった。今後、MERS-CoV S の細胞質内ドメインの欠失変異体の作製を進め、感

染価の高い MERSpv の作製を行う。

Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome in Japan. J Infect Dis. Dec 12. 2013.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

- 1) Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushi S, Tahara M, Nagata N, Ami Y, Mizutani T, Kurane I, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Komase K, Morikawa S, Takeda M. Canine distemper virus associated with a lethal outbreak in monkeys can readily adapt to use human receptors. J Virol. 87(12):7170-7175. 2013.
- 2) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The First Identification and Retrospective Study of

2. 著書

- 1) 福士秀悦、西條政幸 MERS コロナウイルス感染症 感染症内科 1(6),573-578, 2013

2. 学会発表

- 1) 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、宇田晶彦、谷口怜、福間藍子、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の確定診断に使用されるコンベンショナル PCR の評価、及びリアルタイム定量 PCR 戸の比較 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 2) 福間藍子、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、谷口怜、下島昌幸、森川茂、前田健、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)の血清学的診断法の開発 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸
- 3) 長谷川秀樹、亀井敏昭、高橋徹、鈴木忠樹、片野晴隆、中島典子、福士秀悦、下島昌幸、前田健、水谷哲也、森川茂、西條政幸 日本国内で発生した重症熱性血小板減少症候群の 1 剖検例 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日から 12 日、神戸

- 4) 西條政幸、高橋徹、前田健、水谷哲也、大松勉、吉河智城、谷英樹、福士秀悦、下島昌幸、福間藍子、緒方もも子、鈴木忠樹、中島典子、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、山岸拓也、倉根一郎、森川茂 後方視的に重症熱性血小板減少症候群と診断された11名のウイルス学的・臨床的・疫学的研究 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日から12日、神戸
- 5) 森川茂、木村昌伸、福士秀悦、福間藍子、加来義浩、朴ウンシル、谷英樹、吉河智城、井上智、今岡浩一、下島昌幸、西條政幸、前田健 SFTS ウイルス抗体陽性動物の調査 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日から12日、神戸
- 6) 谷口怜、福士秀悦、Masangkay Joseoh、渡辺俊平、大松勉、下田宙、前田健、福間藍子、吉河智城、谷英樹、下島昌幸、西條政幸、明石博臣、吉川泰弘、久和茂、森川茂 フィリピンのコウモリからの重症熱性血小板減少症候群ウイルスに反応する抗体の検出 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日から12日、神戸
- 7) 宇田晶彦、福士秀悦、加来義浩、吉河智城、下島昌幸、新倉綾、井上智、安藤秀二、前田健、西條政幸、森川茂 マダニからのSFTSウイルス遺伝子の検出 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日から12日、神戸
- 8) 下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、福間藍子、谷口怜、前田健、高橋徹、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群ウイルスに対する ribavirin の in vitro 増殖抑制効果 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日から12日、神戸
- 9) 新倉綾、福士秀悦、森川茂、山田靖子 リフトバレー熱ウイルスL蛋白のポリメラーゼ機能におけるC末端領域の重要性 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日から12日、神戸
- 10) 福士秀悦、谷英樹、吉河智城、谷口怜、福間藍子、緒方もも子、下島昌幸、森川茂、西條政幸 ナイジェリアにおけるリフトバレー熱の血清疫学 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日から12日、神戸
- 11) 谷英樹、下島昌幸、福間藍子、谷口怜、吉河智城、福士秀悦、森川茂、前田健、高橋徹、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群ウイルスGPを外套したシュードタイプVSVの作製 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日から12日、神戸
- 12) 高橋徹、前田健、亀井敏昭、水谷哲也、下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、森川茂、長谷川秀樹、中島典子、鈴木忠樹、永田典代、片野晴隆、山岸拓也、大石和徳、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の日本における初症例 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日から12日、神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

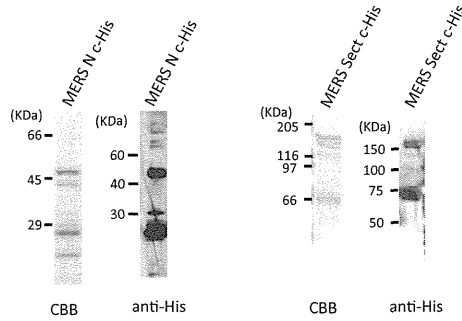
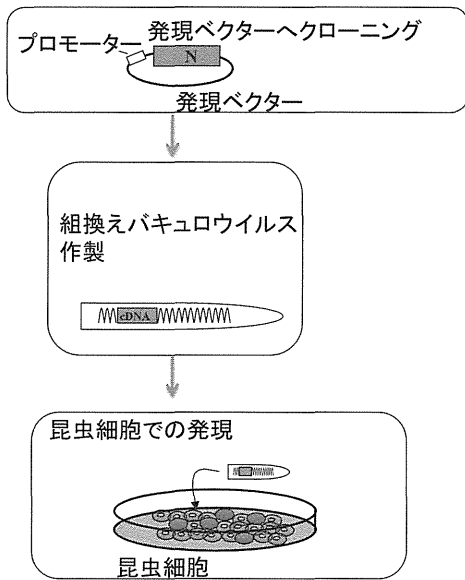
なし

2. 実用新案登録

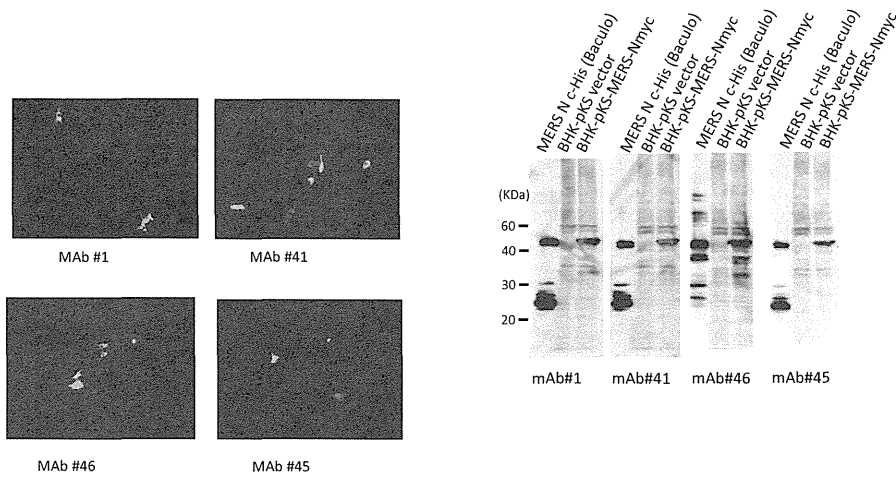
なし

3. その他

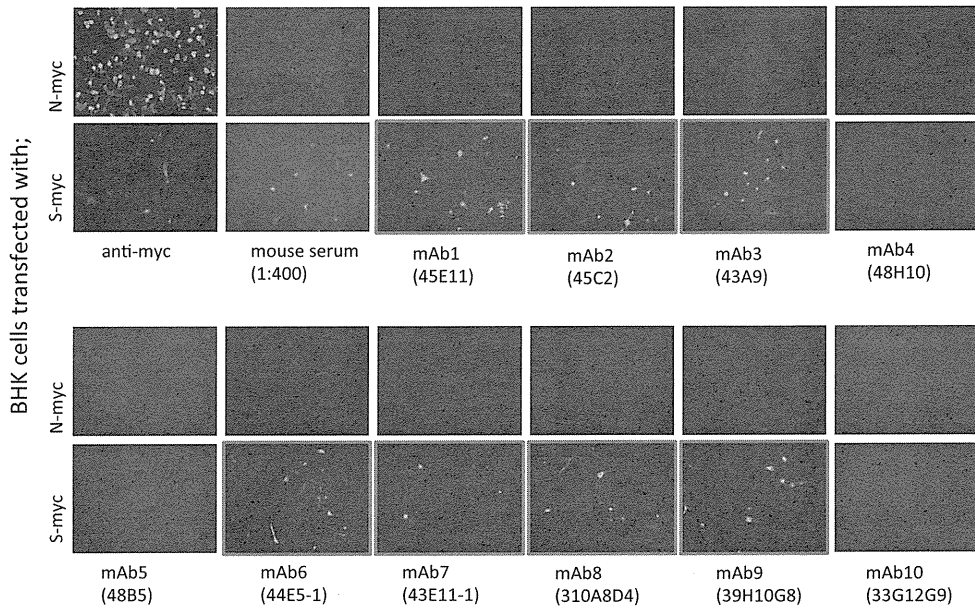
なし



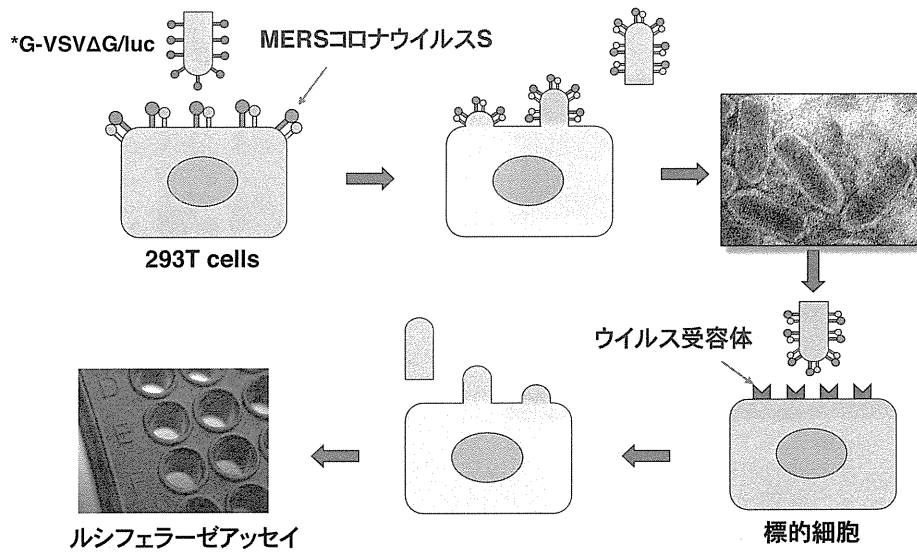
(図1) バキュロウイルス発現系を用いた MERSコロナウイルスN, Sの発現



(図2) MERS-CoV Nに対するmAbの反応性の解析

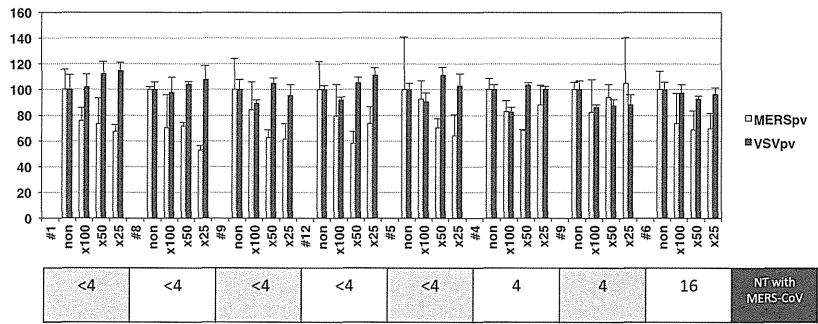


(図3) MERS-CoV Sに対するmAbの反応性の解析



(図4) MERS-CoVシュードタイプVSV(MERSpV)





MERS-CoV感染ラット血清

(図5) MERS-CoVとMERSpvの中和

動物由来感染症の対応に関する研究

分担研究課題：野兔病菌の病原性に関わる遺伝子の同定

研究分担者：宇田晶彦（国立感染症研究所 獣医科学部）

研究要旨：野兔病菌は哺乳類等のマクロファージに感染し、増殖する細胞内寄生菌である。本菌は 10 個以下の菌体でヒトや動物への感染が成立するとされ、極めて高い感染力と病原性を有する事から感染メカニズムを解析する事は公衆衛生上極めて重要である。これまでに我々は、マウス継代を用いて野兔病菌弱毒株（SCHU P0 および P5）から野兔病菌強毒株（SCHU P9）を作出し、両者のゲノム比較解析から *pdpC* 遺伝子がマクロファージ内での増殖およびマウスに対する病原性に極めて重要である事を明らかにしてきた。本研究では、この弱毒株と強毒株の遺伝子発現比較解析により新たな病原因子を同定する事を目的としマイクロアレイ解析を行った。この解析の結果、野兔病菌のタンパク質をコードする 1604 遺伝子の中で強毒株で発現上昇していたのは 19 遺伝子で、2 遺伝子が発現量減少していた。qRT-PCR 解析で同様に有意な発現変動が確認されたのは Pullulanase (*pulB*) 遺伝子のみであった。そこで我々は *pulB* 遺伝子が病原性に関与している可能性が有ると考え、強毒株の *pulB* 遺伝子を破壊した株 ( $\Delta pulB$ ) を作出し、マクロファージ中での生育やマウスに対する病原性を確認した。これらの結果から、*pulB* 遺伝子はマクロファージ中での効率的な生育に必要不可欠であるが、マウスに対する病原性には関与しない事が明らかとなった。

研究協力者：シャルマ・ニークン、藤田修、堀田明豊（国立感染症研究所獣医科学部）

A. 研究目的：

野兔病菌は野兔病を引き起こすグラム陰性の桿菌である。この野兔病菌は非常に感染力が強くわずか 10 個以下の菌体でもヒトへの感染が成立し、健康な皮膚に付着しただけでも体内へ侵入し感染が成立すると

報告されている。これら極めて高い感染力を持つ事から、野兔病菌は日本において 2 種病原体 4 類感染症に分類され、アメリカの CDC ではカテゴリー A に分類されている。故に、高い感染力を保持する野兔病菌の病原因子を同定し、感染機序を解明する事は公衆衛生上必要不可欠である。

野兔病菌の病原因子は *Francisella* Pathogenicity island (FPI) と呼ばれる約

30kbp の領域に集中的にコードされており、その中でも *iglA*, *iglB*, *iglC*, *iglD*, *iglI*, *iglG*, *pdpA*, *pdpB* および *pdpD* は野兎病菌のマクロファージ内での生育やマウスに対する病原性に必要不可欠である事が明らかとなっている。また最近になって FPI にコードされている *pdpC* 遺伝子も病原性に関与している可能性が示唆されている。

国立感染症研究所では野兎病菌 SCHU 株 (*Francisella tularensis* subspecies *tularensis* SCHU) を藤田博巳博士 (福島県大原総合病院) から分与して頂いていたが、本来強毒であるはずの野兎病菌 SCHU 株が弱毒化した。そこで、この弱毒化していた株をマウスで 5 代継代しても弱毒のままの SCHU P5 株と 9 代継代し強毒化させた SCHU P9 株を樹立し、弱毒および強毒株の次世代シーケンサーによる全ゲノム比較解析によって *pdpC* 遺伝子のみが異なる事を明らかにした。本研究では弱毒株と強毒株で mRNA 発現量の異なる遺伝子を検索し、新たな病原性遺伝子を同定する事を試みた。

## B. 研究方法 :

### バクテリア及びウイルスからの核酸抽出 :

*F. tularensis* subsp. *tularensis* (野兎病菌) SCHU P0 株、SCHU P5 株および SCHU P9 株は Chamberlain defined medium (CDM 培地) で培養した後、10%グリセロールを含む CDM 培地に浮遊させ、使用するまで -80°C で保管した。

野兎病菌を CDM 培地で培養し (OD<sub>600</sub>=

2.0~2.5)、遠心にて集菌した後 RNeasy mini kit (Qiagen Ltd., Valencia, CA) を用いて Total RNA を精製した。得られたサンプルは 1 mM EDTA を含む 5 mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液で溶出した。抽出した RNA サンプルの濃度は Nanodrop 1000 (Scrum, Tokyo, Japan) で測定し、マイクロアレイ解析を行うまで -80°C で保管した。

### マイクロアレイのデザイン :

野兎病菌 SCHU S4 株の全ゲノム塩基配列を NCBI からダウンロードした後、Array Designer 3.01 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) へインポートした。野兎病菌 SCHU S4 に添付されていたアノテーション情報に基づき、1604 種類のタンパク質をコードする遺伝子、38 種類の tRNA 遺伝子、および 10 種類の rRNA 遺伝子毎に塩基配列を分割し、各遺伝子ごとに 1 種類のプローブを設計した。プローブの設計時の条件は、60 mer、Tm 75°C ± 5.0°C、ヘアピンループ (< - 3.0 kcal/mol) 及びセルフダイマー (< - 3.0 kcal/mol)、そしてクロスホモロジーは極力避けた。設計したプローブは ProbeMower (Symplus, Tokyo, Japan) を用いてホモロジー検索 (BLAST 検索) および結果取得を行い、十分な特異性を持つ 1652 種類のセンス鎖プローブを選定した。1652 種類のプローブはアレイあたり 7 連でプリントしたマイクロアレイの作製はアジレントに委託した。

### マイクロアレイのハイブリダイゼーションとデータ解析 :

野兎病菌 SCHU P0、P5 および P9 から抽出した Total RNA は 65°C、15 分間熱処理を行った後、Ulysis Alexa Flour 546 Nucleic Acid Labeling Kit (Molecular probes, Eugene, OR) を添加し、80°C、15 分間インキュベートした。標識された RNA はエタノール沈澱した後、70%エタノールでリンスし、乾燥後 25  $\mu$ l の DEPC 処理水で溶解した。各サンプルに 25  $\mu$ l の 2x Fragmentation Buffer (Agilent) を添加した後 50°C、30 分間断片化処理を行い、50  $\mu$ l の 2x Hi-RPM Gene Expression Hybridization Buffer (Agilent) と混合した。100  $\mu$ l のハイブリダイゼーションサンプル溶液はガスケットスライド (Agilent) の上に拵げ、マイクロアレイスライドと張り合わせホルダーにセットした。ハイブリダイゼーションは Hybridization Oven (Agilent) を用いて 65°C、毎分 10 回転で 17 時間行った。ハイブリダイゼーション後のスライドはアジレントプロトコール ver. 6.5 に従い洗浄し、マイクロアレイスキャナーのグリーンレーザーを用いてマイクロアレイスライドの蛍光画像ファイルを取得した。得られた画像ファイルから、Feature Extraction (Agilent) を用いて各スポットの蛍光強度を数値化した。

#### マイクロアレイデータの解析：

Feature Extraction によって出力された SCHU P0、P5、P9 株の遺伝子発現データは GeneSpring GX (Agilent) にインポートし、チップ間 (Shift to 50 percentile) および各遺伝子 (median of all samples) を normalization

(標準化) した。補正したデータから 3 つの株間のいずれかで有意に変動した遺伝子 (2 倍以上、 $p < 0.05$ ) を抽出した。

#### qRT-PCR：

マイクロアレイ解析で得られた弱毒株と強毒株の発現変動を確認する為に、qRT-PCR を行った。各遺伝子特異的なプライマーおよび TaqMan プローブは DNASIS pro ver 3.0 (Hitachi Software Engineering, Tokyo, Japan) で設計し、Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IO) に合成を委託した。この解析には、One Step PrimeScript RT-PCR kit (Perfect Real Time) (Takara, Shiga, Japan) と Applied Biosystem 7500 real time system (Applied Biosystem, Foster city, CA) を使用した。精製した Total RNA をキット付属の PrimeScript で cDNA に変換し、特異的プライマーと Takara Ex Taq HS で増幅し、TaqMan プローブで特異的遺伝子の増幅を確認した。本解析に用いた RT および PCR の条件は以下のとおりである：42°C 5 分、95°C 10 秒の後、40 サイクルの増幅 (95°C 5 秒、55°C 15 秒、72°C 35 秒)。Ct (Threshold cycle) は 7500 SDS ソフトの自動設定を用いて解析を行った。各遺伝子の相対発現量はハウスキーピング遺伝子 (*gapA*) で normalization (標準化) し  $\Delta \Delta Ct$  法を用いて解析を行った。

#### $\Delta pulB$ 株の作出：

野兎病菌の遺伝子破壊株は TargeTron Gene Knockout System (シグマ社) および pKEK1140 プラスミド (Appl Environ

Microbiol. 2008; 74 (9) : 2619- 2626.) を用いて作出した。pKEK1140 プラスミドは Karl E. Klose 博士から分与して頂いた。Targetron を用いて遺伝子破壊を行うにあたり、TargeTron Design Site (<http://www.sigma-geosys.com/targetron/>) に *pulB* 遺伝子の塩基配列をアップロードし、得られた 3 種類のプライマー (IBS、EBS1d、EBS2) および EBS Universal プライマーを用いてキット付属の鋳型イントロンを増幅した。尚 pKEK1140 プラスミドにクローニングする為、IBS プライマーの *HindIII* 制限酵素サイトは *XhoI* サイトへ置換した。得られた PCR 産物を *BsrGI* および *XhoI* 制限酵素で処理し、同処理を行った pKEK1140 に挿入した。このプラスミドは大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (Competent high DH5 $\alpha$ , Toyobo) および NucleoBond PC 100 (MACHEREY-NAGEL, Dueren, Germany) を用いて回収した。pKEK1140 プラスミドは温度感受性野兔病菌用 ori (Ft ori) をコードしているので、30°C では増殖可能だが、37°C で培養するとプラスミドは増殖できない事が知られている。回収したプラスミドで野兔病菌強毒 (SCHU P9) 株をエレクトロポレーションを用いて形質転換し、カナマイシンを含むユーゴンチョコレート寒天培地で 30°C 5 日間培養した後、得られたコロニーを抗生物質を含まないユーゴンチョコレート寒天培地で 37°C で培養した。更に得られた *pulB* 遺伝子破壊 ( $\Delta pulB$ ) 株を CDM で増菌し、10% グリセロールを含む CDM に置換し-80°C で保

管した。

マクロファージ様細胞株 J774.1 細胞における病原性確認：

J774.1 細胞は理研バイオリソースセンターから購入した。J774.1 細胞を 1 nM phorbolmyristate acetate (PMA)、10% FBS、50  $\mu$ g/ml ペニシリン G を含む RPMI1640 培地で 2 日間刺激したのち、10% FBS、50  $\mu$ g/ml ペニシリン G を含む RPMI 1640 培地で更に 2 日間培養した。野兔病菌株は moi=10 で細胞に添加した後、遠心 (1,000xg、10 分) し、37°C 5% CO<sub>2</sub> 存在下で 1 時間インキュベートした。マクロファージに取り込まれなかった細菌を除去するために、培地で 4 回洗浄後、50  $\mu$ g/ml ゲンタマイシンを含む RPMI1640 培地で 1 時間培養し、培地で 4 回洗浄した。洗浄した細胞は 10% FBS、50  $\mu$ g/ml ペニシリン G を含む RPMI 1640 培地で 24 時間培養した。

菌数測定：

J774.1 細胞は、0.1% TritonX-100 を含む CDM 培地で室温 1 分間処理した後、20 倍量の RPMI 1640 で即座に希釈した。このサンプル溶液の 10 倍段階希釈を作成し、ユーゴンチョコレート培地に接種し、37°C で 4-5 日間培養後、コロニーをカウントした。

マウスにおける病原性確認：

7 週齢のマウス (C57BL/6J♀) は日本 SLC から購入した。これらのマウスに野兔病菌株を腹腔内接種し、その生残を観察した。なお、マウス感染実験は国立感染症研究所動物実験委員会の承認を受け BSL3 で実施

した。

### C. 研究成果：

#### 強毒株と弱毒株の遺伝子発現比較解析：

液体培養した SCHU P0、P5、P9 株（各株 n=2）から Total RNA を抽出し、蛍光標識したサンプルと野兔病菌発現アレイを用いてマイクロアレイ解析を行った（図 1）。得られた各株の遺伝子発現強度から 3 株の何れかで有意に変動する遺伝子（2 倍以上かつ  $p < 0.05$ ）を抽出した結果、21 遺伝子が抽出された。これらの 21 遺伝子は弱毒株間（SCHU P0 vs P5）では有意な発現変動は見られず、一方の弱毒株と強毒株（SCHU P0 vs P9 または SCHU P5 vs P9）で有意に発現量に変動しており、強毒株で 19 遺伝子が発現上昇し、2 遺伝子が発現減少していた（図 2）。そこで、マイクロアレイで得られた 21 遺伝子について qRT-PCR による発現変動の確認を試みた。尚、21 遺伝子中 7 遺伝子は qRT-PCR 用のプライマー・プローブセットが設計できなかったため、qRT-PCR 解析から除外した。残りの 14 遺伝子について、マイクロアレイに用いた同じ Total RNA サンプルについて qRT-PCR 解析した。この結果、*pulB* 遺伝子がマイクロアレイと同じ発現変動の傾向かつ有意に変動する遺伝子として同定された（図 2）。

#### 強毒性 SCHU P9 由来 $\Delta pulB$ 株の病原性：

野兔病菌 *pulB* 遺伝子が病原性に関与している可能性を検証する為、強毒性 SCHU P9 株由来の遺伝子破壊株作出が必要とされ

た。そこで、TargeTron システム（Sigma）と野兔病菌用 TargeTron 用プラスミド pKEK1140 を用いて野兔病菌強毒株 SCHU P9 株から *pulB* 遺伝子破壊（ $\Delta pulB$ ）株を作出し（図 3）、マクロファージ細胞内での生育効率およびマウスに対する病原性について検討を行った。弱毒株、強毒株、および  $\Delta pulB$  株をマクロファージに接種した結果、 $\Delta pulB$  株は弱毒株と強毒株の中間的な生育効率が観察された（図 4）。このことから、*pulB* 遺伝子は野兔病菌のマクロファージ中での効率的な生育に必要であり、病原因子である可能性が示唆された。そこで、 $\Delta pulB$  株のマウスに対する病原性の評価を行った。 $10^3$  CFU の各株を 1 群 4 匹のマウスに接種し 7 日間の生残と体重変動を観察した結果、強毒株および  $\Delta pulB$  株を接種したマウスは感染後 4 日までに全て死亡した。一方、弱毒株を接種したマウスは全て生残した。これらの結果から、*pulB* 遺伝子のマウスに対する病原性は限定的である可能性が示唆された。

### D. 考察：

*F. tularensis* は幅広い動物種に感染する能力と極めて高い感染能力と病原性を持つ事は古くから知られていたが、近年になって分子生物学的解析が進められ病原性関与が疑われる遺伝子が次々に同定された。野兔病菌において多くの病原遺伝子は Francisella pathogenecity island（FPI）と呼ばれる領域に集中的にコードされ、それら

の遺伝子の機能が徐々に解明されつつある。これまでに我々は、野兔病菌強毒株は長期間の人工培地による培養で FPI にコードされている *pdpC* 遺伝子が破壊された弱毒性株が大勢を占め弱毒化するが、マウス継代によって正常型 *pdpC* をコードする強毒株が得られることを報告してきた。

この PdpC タンパク質は 156kDa と巨大な分子量を持ち、強塩基性 ( $pI=9.4$ ) である事から、核酸結合性のタンパク質である可能性が考えられた。そこで本研究では、野兔病菌 *pdpC* 遺伝子欠損が他の遺伝子発現に影響を及ぼしていると仮定し、野兔病菌弱毒株および強毒株をマイクロアレイを用いて解析した。この結果、野兔病菌強毒 (SCHU P9) 株では、弱毒 (SCHU P0 および P5) と比較して 19 遺伝子が発現上昇しており、一方で 2 遺伝子が発現減少していた。しかし qRT-PCR を用いた発現量確認試験において、マイクロアレイ解析の発現変動が一致した遺伝子は *pulB* 遺伝子のみだった。

*pulB* (Pullulanase) 遺伝子は  $\alpha$  1-6 結合の糖鎖を切断する酵素で、*Vibrio cholerae* (コレラ菌) においてコレラトキシン等を分泌する為の II 型分泌タンパク質 (Type II secretion system ; T2SS) に関するタンパク質として知られている。II 型分泌タンパク質が欠損したコレラ菌では、コレラ毒素等が菌体内に蓄積し菌外に放出されない事が確認されている。一方で、野兔病菌 *pulB* 遺伝子が同機能を有しているか解析はされ

ていない。本研究では野兔病菌強毒株において発現量が上昇している *pulB* 遺伝子が病原性に関与している可能性を明らかにする為に、強毒 (SCHU P9) 株から *pulB* 遺伝子破壊株 ( $\Delta pulB$ ) を作出した。マクロファージやマウスに感染させ解析をおこなった結果、*pulB* 遺伝子はマクロファージ内での効率的な生育に必要であるが、マウスに対する病原性は無いことが明らかとなった。

本研究では、FPI 外にコードされている *pulB* 遺伝子発現が *pdpC* 遺伝子発現と相関し、マクロファージ内での効率的な野兔病菌増殖に必要不可欠である事を初めて明らかにした。今後、*pdpC* および *pulB* 遺伝子の解析は野兔病菌の感染メカニズム解明に重要であると考えられた。

## E. 結論

野兔病菌強毒株において *pulB* 遺伝子の発現量は上昇しており、マクロファージ内での効率的な生育に必要不可欠である可能性を明らかにした。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1 論文発表

- 1) Akihiko Uda, Tsuyoshi Sekizuka, Kiyoshi Tanabayashi, Osamu Fujita, Makoto Kuroda, Akitoyo Hotta, Naoko Sugiura, Neekun Sharma, Shigeru Morikawa, and

Akio Yamada. Role of pathogenicity determinant protein C (PdpC) in determining the virulence of the Francisella tularensis subspecies tularensis SCHU. PlosOne (*in press*)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



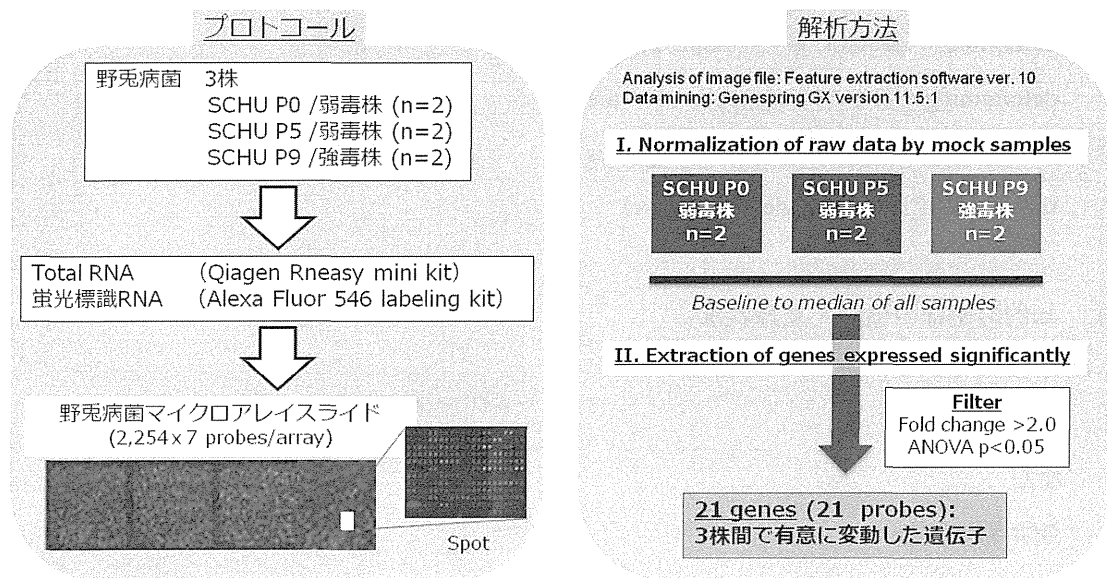


図 1. マイロアレイ解析の概要。

野兎病菌 SCHU P0、P5 および P9 株から Total RNA を抽出後、蛍光標識し野兎病菌アレイにハイブリさせ、洗浄した。マイクロアレイスライドはマイクロアレイスキャナで各遺伝子の蛍光強度を読み取り、Feature Extraction を用いて数値化した。各遺伝子の蛍光強度データは GeneSpring GX を用いて、チップ間 (Shift to 50 percentile) および各遺伝子 (median of all samples) を normalization (標準化) した。補正したデータから 3 つの株間のいずれかで有意に変動した遺伝子 (2 倍以上、 $p < 0.05$ ) を抽出した。

強毒株と弱毒株で有意に発現量が異なる遺伝子：21遺伝子

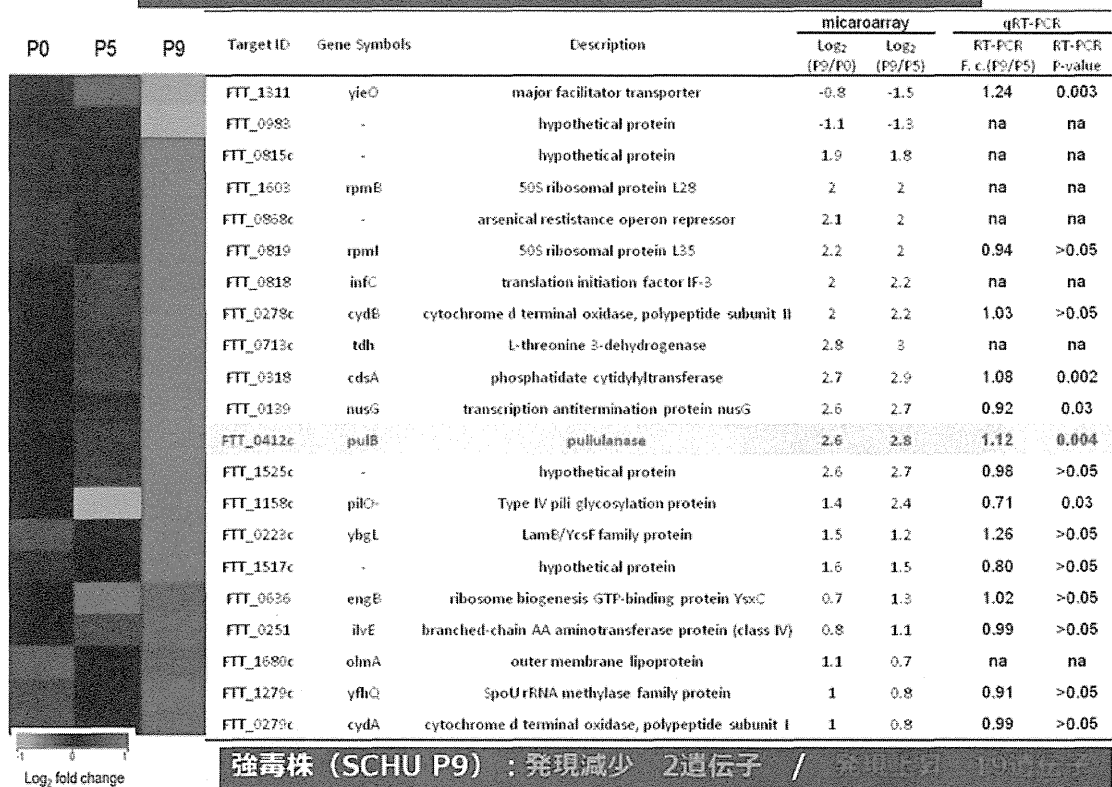
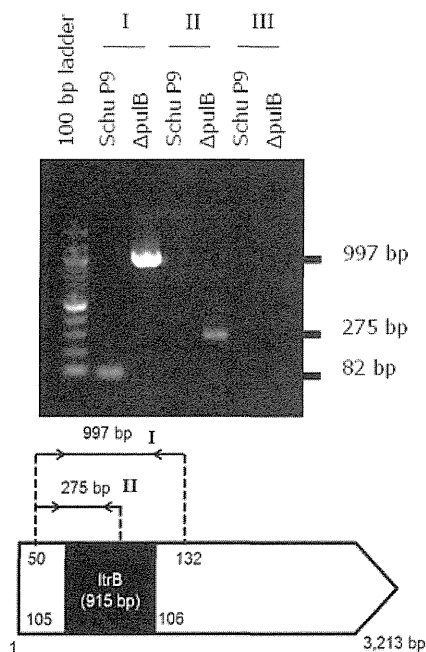


図2. マイクロアレイおよびqRT-PCR解析の結果。

マイクロアレイ解析によって得られた強毒株と弱毒株で有意に発現変動する遺伝子の発現強度のヒートマップ、各々のローカス ID、遺伝子シンボル、遺伝子名称、マイクロアレイ解析によって得られた発現量比、およびqRT-PCRで得られた発現量比を示した。左図のヒートマップの赤色は発現量が高かったことを表し、一方の緑色は発現量が低かったことを示している。

## Δ*pulB* (FTT\_0412c)株の作出：確認

### *pulB*遺伝子へのイントロン挿入確認



- I: Gene Specific sense/antisense primers
- II: Gene specific sense + EBS universal primers
- III: EBS universal + gene-specific antisense primers

### *pulB*株における上・下流遺伝子への発現影響 (Semi quantitative RT-PCR)

*pulB*を破壊しても上流遺伝子 (*glgB*) および下流遺伝子 (*aroE1-2*) 発現に影響しない事が確認された。

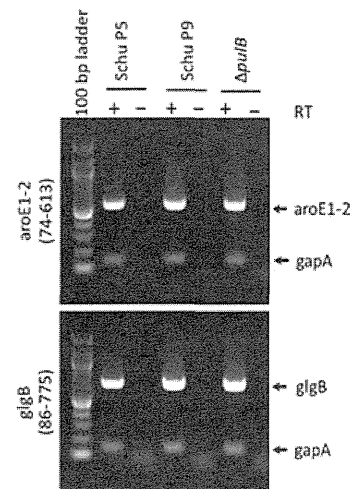
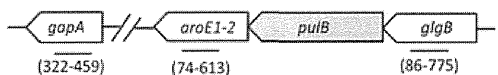


図 3. Δ*pulB* 株の作出

(左図) Δ*pulB* 株からゲノム DNA を抽出し、*pulB* センスプライマー/アンチセンスプライマー (I) 、*pulB* センスプライマー/EBS ユニバーサルプライマー、および EBS ユニバーサルプライマー/*pulB* アンチセンスプライマーを用いて増幅した。得られた増幅産物は 0.7% アガロースゲルで電気泳動し、挿入したイントロン (915bp) の確認を行った。コントロールとして Δ*pulB* 株の親株である SCHU P9 も同様の試験をおこなったが、イントロンの挿入は認められなかった。(右図) *pulB* 遺伝子破壊に伴って、上流 (*glgB*)・下流遺伝子 (*aroE1-2*) の発現量が変動していない事を確認した。SCHU P9 および Δ*pulB* 株から Total RNA を抽出し RT-PCR を行った結果、両株間で上流・下流遺伝子の発現量に差異が無いことが明らかとなった。また RT 無の PCR を行った場合には、また、両株共に増幅産物は認められなかったため、これらのサンプルに DNA のコンタミネーションは無いと考えられた。

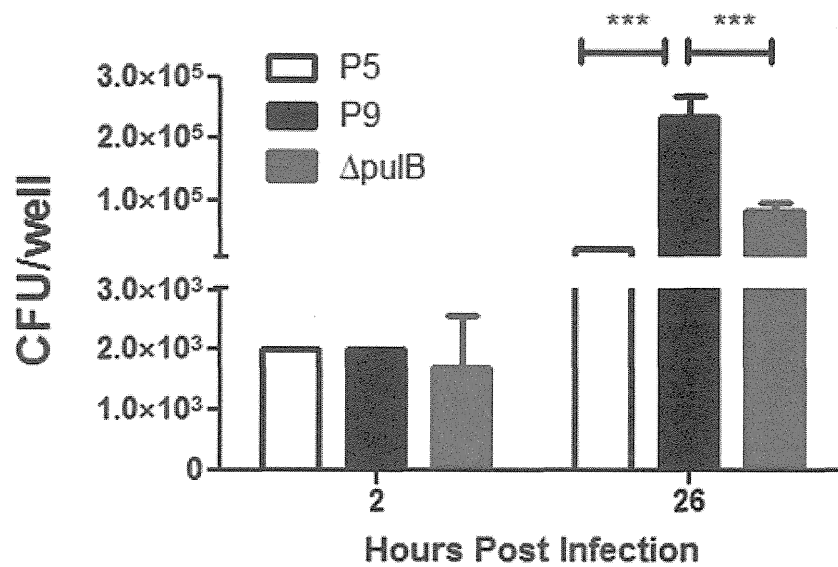


図 4.  $\Delta pulB$  株のマクロファージ内の生育効率。

野兎病菌株は  $moi=10$  で J774.1 細胞に添加した後、 $37^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  存在下で 1 時間インキュベートした。マクロファージに取り込まれなかった細菌を除去するために  $50 \mu\text{g/ml}$  ゲンタマイシンを含む培地で 1 時間培養し、培地で 4 回洗浄後した（感染後 2 時間）。その後、細胞は培地で 24 時間培養した（感染後 26 時間）。感染後 2 時間および 26 時間目の細胞から菌を回収し、CFU を測定した。